

УДК: 577.151:63

Нарушение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сосудах, сердце и легких крыс при накоплении гемсодержащих продуктов в крови **В.П.Филимоненко**

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
Pavel.A.Kaliman @univer.kharkov.ua

Установлено более значительное накопление гемсодержащих продуктов в сыворотке крови при введении глицерола (1 мл/100 г), чем при введении хлорида гемина (1,5 мг/100 г). Показано поступление гема из крови во все исследованные ткани после введения глицерола и только в сосуды после введения гемина. При глицерольной модели рабдомиолиза отмечено повышение уровней ТБК-активных продуктов и белковых карбонильных производных во всех тканях, после инъекции гемина повысилось только содержание ТБК-активных продуктов в сосудах и сердце. Введение глицерола вызвало подавление СОД активности в сердце и легких и повышение каталазной активности в сердце, введение хлорида гемина привело к повышению СОД активности в сердце. Увеличение гемоксигеназной активности наблюдалось в тканях с повышенным содержанием гема. Обсуждается влияние накопления гема в крови на прооксидантно-антиоксидантные статусы исследованных тканей.

Ключевые слова: *глицерол, хлорид гемина, гем, продукты окисления липидов и белков, СОД, каталаза, гемоксигеназа.*

Порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у судинах, серці та легенях щурів за умови накопичення гемовмісних продуктів у крові **В.П.Филимоненко**

Встановлено більш значне накопичення гемовмісних продуктів у сироватці крові при введенні гліцеролу (1 мл/100 г), ніж при введенні хлориду геміну (1,5 мг/100 г). Показано надходження гему з крові до усіх тканин, що досліджувалися, після введення гліцеролу і лише до судин після введення геміну. За гліцерольної моделі рабдоміолізу відмічено підвищення рівню ТБК-активних продуктів та білкових карбонільних похідних в усіх тканинах, після ін'єкції геміну підвищився вміст лише ТБК-активних продуктів у судинах та серці. Введення гліцеролу спричинило пригнічення СОД активності у серці та легенях і підвищення каталазної активності у серці, введення хлориду геміну викликало збільшення СОД активності у серці. Підвищення гемоксигеназної активності спостерігалось у тканинах зі збільшеним вмістом гему. Обговорюється вплив накопичення гему у крові на прооксидантно-антиоксидантні статуси досліджених тканин.

Ключові слова: *гліцерол, хлорид геміну, гем, продукти окислення ліпідів та білків, СОД, каталаза, гемоксигеназа.*

The disorders of prooxidant-antioxidant balance in rat vessels, heart and lung under blood heme-containing products accumulation **V.P.Fylymonenko**

The more considerable accumulation of the heme-containing products in blood serum was found under glycerol administration (1 ml/100 g) than under hemin chloride administration (1.5 mg/100 g). The heme transport was shown in all tissues studied after glycerol injection and only in vessels after hemin injection. The increase of TBA-reactive products and protein carbonyl derivatives levels was noted under glycerol model of rhabdomyolysis, under hemin administration only content of TBA-reactive products elevated in vessels and heart. The glycerol administration caused inhibition of SOD activity in heart and lung and increasing of catalase activity in heart, the hemin chloride administration caused elevation of SOD activity in heart. The heme oxygenase activity increasing was observed in tissues in which heme was elevated. The action of heme accumulation in blood on prooxidant-antioxidant status of tissues studied is discussed.

Key words: *glycerol, hemin chloride, heme, products of lipid and protein oxidation, SOD, catalase, heme oxygenase.*

Введение

Накопление гема и гемсодержащих продуктов в кровяном русле происходит главным образом в результате внутрисосудистого разрушения эритроцитов и выхода из них гемоглобина (Калиман, Баранник, 2001). Кроме того, ряд патологических состояний сопровождается разрушением клеток поперечно-полосатой мускулатуры и высвобождением миоглобина в кровоток, что вызывает также и

гемолиз. Миолиз и его последствия обозначают как рабдомиолиз (Vanholder, 2000). Основные причины гемолиза и миолиза показаны на схеме 1.



Схема 1. Причины и последствия накопления гемсодержащих продуктов в крови

Известно, что накапливающиеся в крови гем и гемопротейны связываются белками плазмы и переносятся по рецепторопосредованному механизму в клетки, имеющие соответствующие рецепторы (Wagener et al., 2003). Такой специфический путь обеспечивает быстрое обезвреживание гема, реутилизацию железа и предотвращает активацию свободнорадикальных процессов. Однако при более значительном накоплении гем и гемопротейны неспецифически связываются с липопroteинами крови, а также плазматическими мембранами различных клеток и проникают внутрь, вызывая активацию свободнорадикального окисления (Jeneu et al., 2002; Balla et al., 2003).

В нашей лаборатории, а также зарубежными исследователями показано, что при умеренном повышении концентрации гемсодержащих продуктов в крови поступление гема происходит в основном в печень, а при более значительном накоплении главной мишенью становятся почки (Никитченко и др., 1992; Nath et al., 1992). Ткани сосудов, сердца и легких в условиях накопления гемсодержащих продуктов в крови остаются малоизученными.

В связи с этим, целью данной работы было исследование некоторых показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса сыворотки, сосудов, сердца и легких крыс при глицериновой модели рабдомиолиза и введении хлорида гема.

Объекты и методы исследования

Работа выполнена на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 180–250 г. Животные были разделены на 6 групп: 2 группы – животные, которым вводили глицерол в дозе 1 мл 50%-го водного раствора на 100 г массы тела по $1/2$ дозы в каждую бедренную мышцу, 2 группы – животные, которым вводили хлорид гема внутривентриально в дозе 1,5 мг на 100 г массы тела, и 2 группы – контрольные животные, которым вводили соответствующий объем 0,9%-ного NaCl. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом через 2 и 24 ч после воздействия. Исследованные показатели изучались в сыворотке крови, гомогенате сосудов и постмитохондриальных фракциях сердца и легких.

Содержание общего гема определяли пиридингемохромным методом (Paul et al., 1953). Гемоксигеназную активность определяли методом двулучевой спектрофотометрии (Sardana et al., 1985) и рассчитывали по количеству образовавшегося билирубина. Уровень ТБК-активных продуктов определяли, как описано в работе (Ohkawa et al., 1979). Содержание белковых карбонильных

производных определяли с 2,4-динитрофенилгидразином (Levine et al., 1994). Для определения супероксиддисмутазной активности использовали спектрофотометрический метод, основанный на ингибировании реакции восстановления тетранитротетразолиевого синего до формазана супероксидными радикалами, образующимися в ксантиноксидазной реакции (Ланкин, Гуревич, 1976). Каталазную активность определяли спектрофотометрическим методом по убыли перекиси водорода (Murclund et al., 1981). Содержание белка оценивали методом Лоури в модификации Миллера.

Результаты экспериментов обрабатывали статистически, достоверность различий рассчитывали с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни для групп с ненормальным распределением признака и параметрического классического или модифицированного t-критерия Стьюдента для групп с нормальным распределением признака (Гланц, 1998). Расхождение считали статистически значимым при $p \leq 0,05$.

В работе использованы следующие реактивы: NADPH и альбумин производства "AppliChem GmbH" (Германия), 2-тиобарбитуровая кислота производства "Organica" (Германия), бутанол и мочевины производства "Merck" (Германия), пиридин и дезоксихолат натрия производства "Fluka" (Швейцария), остальные реактивы отечественного производства марки ч.д.а. или х.ч.

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, оба использованных агента вызвали накопление гемосодержащих продуктов в сыворотке крови, но глицерол – более значительное (в 19 раз), в то время как хлорид гемина – лишь 3-кратное повышение. При этом поступление гема наблюдалось во все исследованные ткани при экспериментальном рабдомиолизе и только в сосуды – при введении экзогенного гемина. Повышение уровня гема в органах коррелирует с динамикой накопления гема в сыворотке с коэффициентами корреляции не меньше 0,77.

Одновременно с повышением содержания гема во всех тканях при введении глицерола отмечено увеличение уровня ТБК-активных продуктов (рис. 2). Введение хлорида гемина привело к увеличению уровня этих веществ в сыворотке, сосудах и сердце.

Содержание белковых карбонильных производных повысилось во всех тканях при глицерольной модели рабдомиолиза и не изменилось при введении гемина (рис. 3). Известно, что карбонильные группы белков образуются в результате окисления аминокислотных остатков как непосредственно активными формами кислорода, так и при взаимодействии с продуктами окисления липидов (Луцак, 2007). Накопление последних наблюдалось в нашем эксперименте. О развитии оксидативного стресса в легких крыс через 6 ч после инъекции глицерола свидетельствуют также данные литературы (Rodrigo et al., 2006).

Увеличение уровня продуктов окисления липидов и белков в тканях коррелирует с динамикой накопления гема, подтверждая прооксидантные свойства свободного гема. Исключение составляет повышение содержания ТБК-активных продуктов в сердце через сутки после введения хлорида гемина – оно связано с усиленным образованием оксида азота в NO-синтазных реакциях (Калиман и др., 2008).

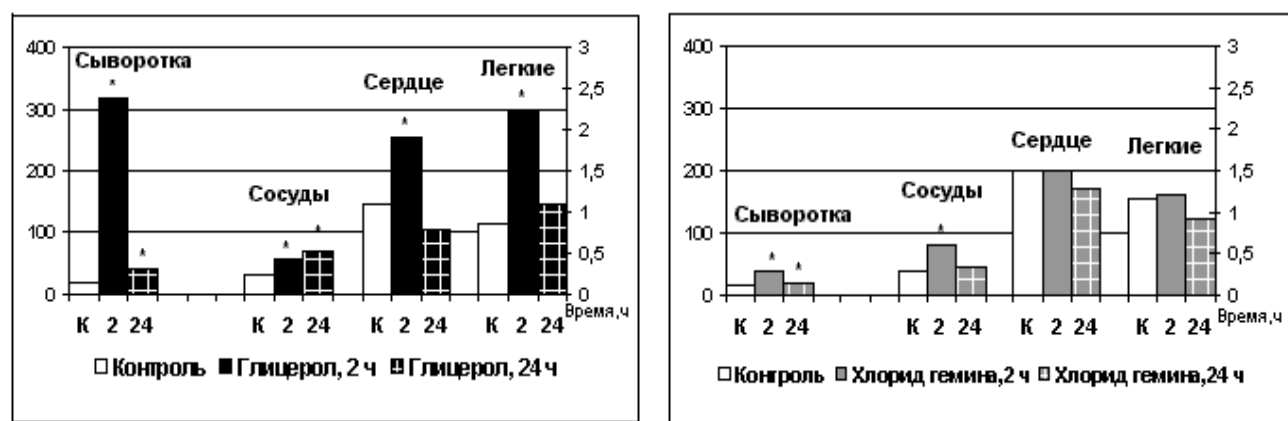


Рис. 1. Содержание общего гема в сыворотке (нмоль на 1 мл) и тканях (нмоль на 1 мг белка) крыс при введении глицерола (слева) и хлорида гемина (справа)

Примечание: * – $P \leq 0,05$ по отношению к контролю.

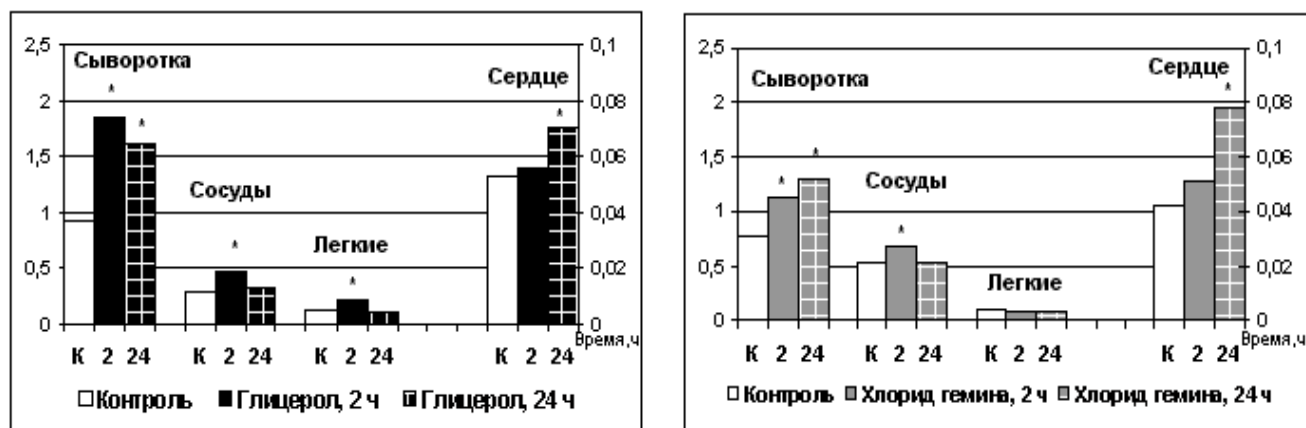


Рис. 2. Содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке (нмоль на 1 мл) и тканях (нмоль на 1 мг белка) крыс при введении глицерола (слева) и хлорида гемеина (справа)

Примечание: * – $P \leq 0,05$ по отношению к контролю.

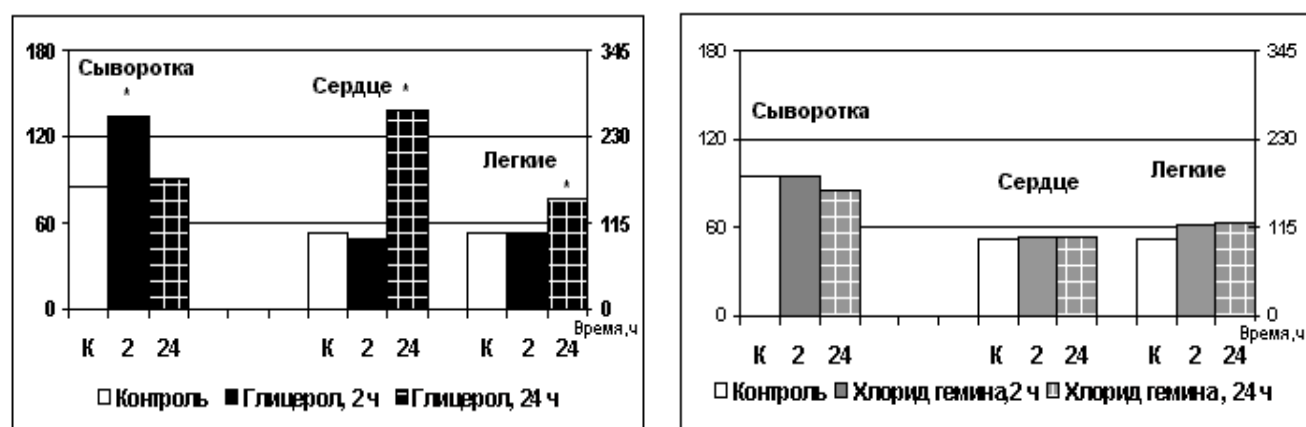


Рис. 3. Содержание белковых карбонильных производных в сыворотке (% по отношению к контролю) и тканях (% по отношению к контролю) крыс при введении глицерола (слева) и хлорида гемеина (справа)

Примечание: * – $P \leq 0,05$ по отношению к контролю.

Кроме того, введение глицерола повлияло и на активности антиоксидантных ферментов: снизило СОД активность в сердце и легких и повысило каталазную активность в сердце (табл. 1). Изменение активности супероксиддисмутазы коррелирует с динамикой накопления белковых карбонильных производных. Следовательно, подавление СОД активности может быть связано с окислительным повреждением молекул фермента (Меньщикова и др., 2006). Повышение активности каталазы в сердце, вероятно, обусловлено индукцией фермента в ответ на накопление перекиси водорода, которое показано в почках при глицерольной модели рабдомиолиза (Guidet, Snah, 1989). После инъекции хлорида гемеина отмечено повышение СОД активности в сердце (табл. 1), которое, возможно, вызвано активацией синтеза фермента *de novo* вследствие повышения внутриклеточной концентрации субстрата – $O_2^{\cdot -}$.

Один из механизмов защиты клеток от прооксидантного действия гема – его разрушение в гемоксигеназной реакции. К настоящему времени хорошо охарактеризованы 2 изоформы гемоксигеназы: индуцибельная (ГО-1) и конститутивная (ГО-2) (Maines, 1997). ГО-1 рассматривается как стрессорный белок, который индуцируется в ответ на действие различных стресс-факторов и обеспечивает защиту клеток от повреждения в этих условиях (Otterbein, Choi, 2000; Morse, Choi, 2002). Важность индукции ГО-1 в почках при глицерольном рабдомиолизе продемонстрирована авторами работы (Nath et al., 2000): у животных, нокаутированных по гену данного изофермента, развивалась тяжелая почечная недостаточность со 100%-ной летальностью.

В нашем эксперименте введение глицерола вызвало повышение ГО активности во все сроки в сосудах и через 24 ч после воздействия – в сердце и легких (табл. 1). При введении же экзогенного гемеина активность данного фермента повысилась только в сосудах. Использование более высокой дозы хлорида гемеина (2,5 мг/100 г массы тела) индуцировало гемоксигеназу и в сердце (Кукоба та ін., 2006). Как видно из полученных нами результатов, повышение гемоксигеназной активности

произошло только в тех тканях, где установлено накопление гема, т.е., очевидно, опосредовано накоплением гема и обусловлено синтезом de novo индуцибельной формы гемоксигеназы – ГО-1.

Таблица 1.

Активности гемоксигеназы (ГО, пмоль билирубина/мин/мг белка) в сосудах (медиана (квартили), n=3–5), легких и сердце (M±s, n=3–8), супероксиддисмутазы (СОД, усл.ед./мин/мг белка) и каталазы (мкмоль H₂O₂/мин/мг белка) в сердце и легких (M±s, n=3–8), * – P≤0,05 по отношению к контролю

Группа Показатель	Глицерол			Хлорид гема		
	Контроль	2 ч	24 ч	Контроль	2 ч	24 ч
Сосуды						
ГО	23±4	41±6*	38±8*	21 (19÷23)	32 (29÷42)*	26(25÷34)*
Сердце						
ГО	22±3	25±2	31±3*	26±4	24±2	27±3
СОД	243±27	226±30	176±21*	386±24	442±44*	684±136*
Каталаза	28±2	27±3	44±6*	19±3	22±3	20±2
Легкие						
ГО	27±2	29±3	37±4*	28±3	30±5	27±4
СОД	201±23	193±17	166±2*	309±46	293±34	292±37
Каталаза	23±3	25±3	23±2	21±2	18±3	21±2

Таким образом, поступление гема в ткани определяется уровнем гемсодержащих продуктов в крови. Введение глицерола вызвало более значительное накопление общего гема в сыворотке, что привело к поступлению гема не только в сосуды, но и в сердце и легкие. При этом во всех исследованных тканях наблюдалось повышение гемоксигеназной активности и сдвиг антиоксидантно-прооксидантного баланса в сторону образования прооксидантов.

Список литературы

- Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М., Практика, 1998. – 459с.
- Калиман П.А., Баранник Т.В. Метаболизм гема и оксидативный стресс // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т.73, №1. – С. 5–15.
- Калиман П.А., Филимоненко В.П., Никитченко И.В. Гемоксигеназная активность в тканях сосудов и сердца крыс при совместном введении ингибитора NO-синтаз и хлорида гема // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т.80, №2. – С. 128–134.
- Кукоба Т.В., Коцюруба А.В., Мойбенко О.О. Вплив експресії та активності гемоксигенази-1 на функції серця при ішемії-реперфузії // Фізіол. журн. – 2006. – Т.52, №1. – С. 41–48.
- Ланкин В.З., Гуревич С.М. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментными системами (супероксиддисмутазой, глутатионпероксидазой и глутатионредуктазой) при экспериментальном злокачественном росте // Докл. АН СССР. – 1976. – Т.226, №3. – С. 705–708.
- Луцак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. – 2007. – Т.72, вып.8. – С. 995–1017.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556с.
- Никитченко И.В., Конеру А., Литвин Л.А. Активность ключевых ферментов метаболизма гема и содержание некоторых гемопротеинов в печени крыс разных возрастов при введении гема // Биохимия и физиология возрастного развития организма: Сборник научных трудов ХГУ. – К.: Наук. думка, 1992. – С. 158–163.
- Balla J., Vercellotti G.M., Nath K. et al. Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cells injury // Nephrol. Dial. Transplant. – 2003. – Vol.5. – P. 8–12.
- Guidet R., Snah S.V. Enhanced in vivo H₂O₂ generation by rat kidney in glycerol model of ARF // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 1989. – Vol.257. – P. 440–445.
- Jeney V., Balla J., Yachie A. et al. Prooxidant and cytotoxic effects of circulating heme // Blood. – 2002. – Vol.100, №3. – P. 879–887.
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins // Methods Enzymol. – 1994. – Vol.233. – P. 346–357.
- Maines M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases // Annu. Rev. Pharmacol Toxicol. – 1997. – Vol.37, №1. – P. 517–554.

- Morse D., Choi A.M.K. Heme oxygenase-1. The “emerging molecule” has arrived // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2002. – Vol.27, №1. – P. 8–16.
- Murclund S., Nordensson J., Back J. Normal Cu,Zn-superoxide dismutase, Mn-Sod, catalase and glutathione peroxidase in Werner`s syndrome // *J. Gerontol.* – 1981. – Vol.36, №4. – P. 405–409.
- Nath K.A., Balla G., Vercellotti G.M. et al. Induction of heme oxygenase is a rapid protective response in rhabdomyolysis in the rat // *J. Clin. Invest.* – 1992. – Vol.90, №1. – P. 267–270.
- Nath K.A., Haggard J.J., Croatt A.J. et al. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity *in vivo* // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol.156, №5. – P. 1527–1535.
- Ohkawa H., Ohani N., Jadi K. Assay for peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol.95, №2. – P. 351–358.
- Otterbein L.E., Choi A.M.K. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2000. – Vol.279, №6. – P. 1029–1037.
- Paul K.G., Theorell H., Akeson A. The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen) // *Jacta Chem. Scand.* – 1953. – Vol.7, №9. – P. 1284–1287.
- Rodrigo R., Trujillo S., Bosco C. Biochemical and ultrastructural lung damage induced by rhabdomyolysis in rat // *Exp. Biol. and Med.* – 2006. – Vol.231, №8. – P. 1430–1438.
- Sardana M.K., Sassa S., Kappas A. Hormonal regulation of heme oxygenase induction in avian hepatocyte culture // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – Vol.34, №16. – P. 2937–2944.
- Vanholder R., Sever H., Ereck E., Lamerle N. Rhabdomyolysis // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2000. – Vol.11, №8. – P. 1553–1561.
- Wagener F.A.D.T.G., Volk H.D., Willis D. et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation // *Pharmacol. Rev.* – 2003. – Vol.55, №3. – P. 551–571.

Представлено: В.І.Жуковим

Рекомендовано до друку: В.А.Бондаренком

© В.П.Филимоненко, 2009